



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

**Estudi dels polihidroxicanoats acumulats per *Pseudomonas aeruginosa* 42A2: producció i caracterització**

Mònica Bassas i Galià 2007





UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Programa de doctorat: Química Orgànica (Facultat de Químiques)

BIENNI 2002-2004

Estudi dels polihidroxicanoats acumulats per *Pseudomonas aeruginosa* 42A2: producció i caracterització

Memòria presentada per **Mònica Bassas i Galià** per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Director/a:

Dra. Àngels Manresa i Presas

Dr. Joan Llorens i Llacuna

Doctorand:

Mònica Bassas i Galià

**Mònica Bassas i Galià, 2007**

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Biopolímers. Els plàstics del futur ?

Actualment, es pot considerar que vivim a l'era dels plàstics. En els últims 50 anys els plàstics d'origen petroquímic han esdevingut un dels materials més emprats. La seva versatilitat, propietats tècniques i un cost relativament baix (0,70\$US per Kg) són alguns dels factors que han influït en la proliferació del seu ús. Fins al moment han estat descrites moltes i molt diverses aplicacions per aquest material. El plàstic és emprat en la fabricació de components de cotxes, accessoris per a la llar, en el camp de la informàtica, en la indústria de la construcció, en el camp dels esports i del lleure, per embalatges i també per aplicacions mèdiques. Aquestes són tan sols algunes de les àrees on l'ús del plàstic ha esdevingut indispensable (Zinn *et al.*, 2001).

Els plàstics són compostos orgànics i polimèrics obtinguts per síntesi o bé procedents de substàncies naturals que poden ésser transformats mitjançant l'aplicació de calor i de pressió. Així doncs, els plàstics, com a polímers sintètics, permeten la modificació química de la seva estructura donant lloc a una gran varietat de materials amb diferents propietats i diferents formes. S'anomena plàstic a una gran varietat de polímers, tals com el polietilè, el clorur de polivinil, el poliestirè, el polipropilè, etc. Tots aquests materials tenen en comú que la base de la seva producció és el petroli. Una estimació aproximada en situa la producció en més de 100 milions de tones anuals.

El consum anual per càpita de plàstic és de 80 Kg als EUA, de 60 Kg als països europeus i 2 de Kg a la Índia (Kalia *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2003).

L'ús dels plàstics com a alternativa a d'altres materials ha augmentat considerablement els darrers anys. Estudis realitzats a principis dels anys 80s, situaven en 133 milions de tones els residus sòlids i d'aquests un 30 % eren plàstic. A l'any 2003, la producció global de plàstics ja era de 202 milions de tones anuals i s'espera un increment aproximat del 5 % anual fins a l'any 2010 (Kunststoffe, 2004). L'augment de l'ús d'aquest material i per tant dels residus sòlids que es generen porta associat un problema mediambiental molt important com és la contaminació de sòls i aigües, ja que centenars de milers de tones de plàstics s'acumulen no tan sols en abocadors sinó també en diferents entorns marins i oceànics. D'acord amb Moore *et al.*, (2001), els residus plàstics entre les costes de Califòrnia i Hawaii representen sis vegades la massa del plàncton autòcton (Moore *et al.*, 2001).

El principal desavantatge dels plàstics convencionals és la seva baixa biodegradabilitat. Aquests residus plàstics no són biodegradables i els costos dels processos de reciclatge són molt elevats (Yu *et al.*, 1998). D'altra banda, la disponibilitat, l'accessibilitat i l'explotació de les fonts de carboni d'origen fòssil són cada vegada més limitades. Tots aquests factors han fet que el preu del petroli estigui en un continu increment des de fa un parell de dècades. El fet que sigui una font d'energia no renovable, conjuntament amb l'augment del seu cost ha fet necessari buscar altres fonts d'energia alternatives, per la qual cosa l'aplicació de processos biotecnològics ha despertat gran interès pel seu potencial.

Per aquest motiu, al començament dels anys 80s, es comencen a realitzar diferents aproximacions en el desenvolupament i en la producció de plàstics biodegradables com per exemple:

- i) la inserció de polímers naturals als plàstics convencionals mitjançant síntesi química donant lloc als *plàstics semi-biodegradables*, (Johnstone, 1990)
- ii) l'addició de grups fotosensibles a la cadena central, facilitant així que la radiació ultravioleta pugui disgregar l'estructura polimèrica de manera que en facilita la posterior degradació bacteriana, *plàstics fotodegradables* (Kalia *et al.*, 2000).
- iii) Obtenció de biopolímers (*plàstics totalment biodegradables*) emprant processos fermentatius amb microorganismes (Yu *et al.*, 1998).

El desenvolupament de plàstics biodegradables d'origen natural o bé d'origen biològic a partir de fonts renovables ha esdevingut un camp de recerca important. Així doncs, els biopolímers com la cel·lulosa, el midó, la quitina, la poliamida, l'àcid polilàctic (PLA) i els polihidroxialcanoats (PHAs) han estat considerats com una alternativa als "petroplàstics" o plàstics convencionals.

De tots aquests bioplàstics, els PHAs han despertat un interès especial ja que és un material biodegradable i biocompatible. Mitjançant cultius amb bacteris es poden obtenir polímers totalment èstereoespecífics (tots els carbonis quirals de la cadena central tenen configuració [R]) i aquesta és una característica important per a la biodegradabilitat i biocompatibilitat d'un material (Findlay and White, 1983).

Alguns PHAs presenten propietats mecàniques semblants a alguns termoplàstics sintètics (p.e. el polipropilè) (Lee, 1996), (Steinbüchel and Fuchtenbusch, 1998) i per

altra banda el fet de ser materials biocompatibles fa que siguin bons candidats en el camp de la biomedicina (Steinbüchel and Fuchtenbusch, 1998), (Zinn *et al.*, 2001). El fet de ser materials degradables biològicament i biocompatibles fa que siguin productes no agressius amb el medi ambient, i per tant d'elevat interès industrial.

Alguns exemples de biomaterials ja comercialitzats són: el PHB que va ser desenvolupat per ICI (Imperial Chemical Industries) el 1975-76 com a resposta de l'augment del preu del petroli. Posteriorment ICI comença a produir un copolímer del PHB (PHB-co-PHV), el "Biopol". Un altre exemple és el de Cargill Dow Polymers que comercialitza la seva resina "Eco-plan" al Japó, i Nippon Gohsei, també al Japó, produeix "Mater-Bi" (material que té com a base el midó) i que és emprat com a material d'embalatge en el transport de d'objectes elèctrics.

## 1.2. Els polihidroxicanoats (PHAs)

### 1.2.1 Revisió històrica

La presència de inclusions lipídiques (sudanofíliques) solubles en cloroform ja fou observada a principis del segle XX en *Azotobacter chroococcum*, però no fou fins el 1925 quan Lemoigne aconsegueix aïllar els polièsters bacterians en *Bacillus megaterium* i caracteritzar-los com a poli(3-hidroxi-butirat) P(3HB). Cap a finals dels anys 50s, diferents estudis demostraren que els polihidroxi-butirats eren un reservori intracel·lular d'energia i de font de carboni i que aquest fenomen estava molt estès en els bacteris gramnegatius i grampositius. En un treball publicat el 1973 on s'estudiaven els polímers de reserva i el seu paper en la regulació energètica dels microorganismes, es compara el P3HB amb el midó i el glicogen (Dawes, 1973).

Durant molts anys, es va pensar que el P(3HB) era l'únic tipus de polièster produït per microorganismes i no fou fins el 1974 quan Wallen i Rohwedder identifiquen i descriuen d'altres polièsters, aïllats de fangs d'aigües residuals, que contenen cadenes de 3-hidroxicanoats més llargues que les del polihidroxi-butirat (Wallen and Rohwedder, 1974). Aquest "nou" polímer estava format per cadenes de 3-hidroxi-butirat (3HB) i de 3-hidroxi-valerat (3HV) majoritàriament però també es va detectar la presència de 3-hidroxi-hexanoat (3HHx) i 3-hidroxi-heptanoat (3HHp) com a components minoritaris. També s'observà que en d'altres PHAs extrets de sediments

marins contenen fins a 11 tipus diferents de 3-hidroxiàlcanoats (3HA). En la Taula 1.1 es pot observar alguns exemples dels primers PHAs identificats en alguns microorganismes específics i entorns ambientals:

**Taula 1.1.** Composició monomèrica dels PHAs sintetitzats per diferents microorganismes i aïllats d'alguns entorns ambientals. On 3HB: 3-hidroxiabutirat; 3HV: 3-hidroxi valerat; 3HHx: 3-hidroxihexanoat; 3HHp: 3-hidroxiheptanoat; 3HO: 3-hidroxi octanoat; 3HD: 3-hidroxi decanoat; 3UD: 3-hidroxi undecanoat i 3HDOD: 3-hidroxi dodecanoat (Kim and Lenz, 2001).

	Unitats de 3- hidroxiàlcanoats							
	3HB	3HV	3HHx	3HHp	3HO	3HD	3HUD	3HDOD
<i>Rhodospirillum. rubrum</i>	x	x	x	x				
<i>Rhodobacter Sphaeroidis</i>	x	x						
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Pseudomonas cepacia</i>	x	x						
<i>Ralstonia eutropha</i>	x	x						
<i>Bacillus megaterium</i>	x	x						
<i>Aphanotheco</i>	x	x						
<i>Microvoleus</i>	x	x						
Sediments marins	x	x	x	x	x			
Aigües residuals	x		x		x			
Fangs d'aigües residuals	x	x	x	x				

El 1983, Witholt i col·laboradors van fer créixer *Pseudomonas oleovorans* en un medi de cultiu amb n-octà com a substrat, les anàlisis estructurals del polímer demostraren que estava constituït principalment per unitats de 3-hidroxi octanoat (3HO) (De Smet *et al.*, 1983). Aquest fet, conjuntament amb la identificació d'altres unitats de HA diferents als 3HB provoca un interès creixent en la investigació i comercialització d'aquests biopolímers bacterians.

Així com l'homopolímer de P(3HB) és un material fràgil i per tant amb aplicacions molt limitades, la incorporació d'una segona unitat monomèrica dins del polímer de P(3HB) confereix al material d'altres aplicacions potencials. A partir d'aquest moment es marca un punt i a part en la investigació i en l'estudi dels PHAs. Malgrat que el P(3HB) havia estat el PHA més utilitzat, a partir d'aquest moment es comença la producció a nivell industrial del copolímer de P(3HB)-co-P(3HV), que es comercialitza amb el nom de BIOPOL®.

En la dècada dels anys 80s, la majoria de la recerca es dirigeix a la identificació i caracterització de tots els àcids hidroxiàlcànics (HA) potencials de formar part d'aquests polièsters bacterians. Aquest fet porta a la identificació de més de 125 tipus diferents d'unitats de 3HA (Rehm and Steinbüchel, 1999) incloses algunes unitats de 4HA i 5HA (Williams *et al.*, 1999), tal i com es pot observar en la Taula 1.2:

**Taula 1.2.** Tipus de monòmers identificats per a diferents polihidroxicanoats (PHAs), (Witholt and Kessler, 1999)

3-hidroxi àcids	3-hidroxi àcids (insaturats)	3-hidroxi àcids (ramificats)	3-hidroxi àcids (funcionalitzats)	D'altres hidroxi àcids
propionic	2-butenoic	2-metil-butíric	ciclohexil-butíric	4-hidroxi-butíric
butíric	4-pentenoic	2-metil-valèric	5-fenil-valèric	4-hidroxi-valèric
valèric	4-hexenoic	2,6-dimetil-5-heptenoic	7-fluoro-heptanoic	4-hidroxi-hexanoic
hexanoic	5-hexenoic	4-metil-hexanoic	9-fluoro-nonanoic	4-hidroxi-heptanoic
heptanoic	6-heptenoic	5-metil-hexanoic	6-cloro-hexanoic	4-hidroxi-octanoic
octanoic	6-octenoic	6-metil-octanoic	8-cloro-octanoic	5-hidroxi-valèric
nonanoic	7-octenoic	7-metil-octanoic	3-bromo-hexanoic	5-hidroxi-hexanoic
decanoic	8-nonenoic	6-metil-nonanoic	8-bromo-octanoic	màlic
undecanoic	9-decenoic	7-metil-nonanoic	11-bromo-undecanoic	
dodecanoic	10-undecenoic	8-metil-nonanoic	7-ciano-heptanoic	
tetradecanoic	6-dodecenoic	7-metil-decanoic	9-ciano-nonanoic	
	5-tetradecenoic	9-metil-decanoic	12-hidroxi-dodecanoic	
	5,8-tetradecadienoic			
	5,8,11-tetradecatrienoic			
	4-hexedecenoic			
	4,7-hexadecadienoic			

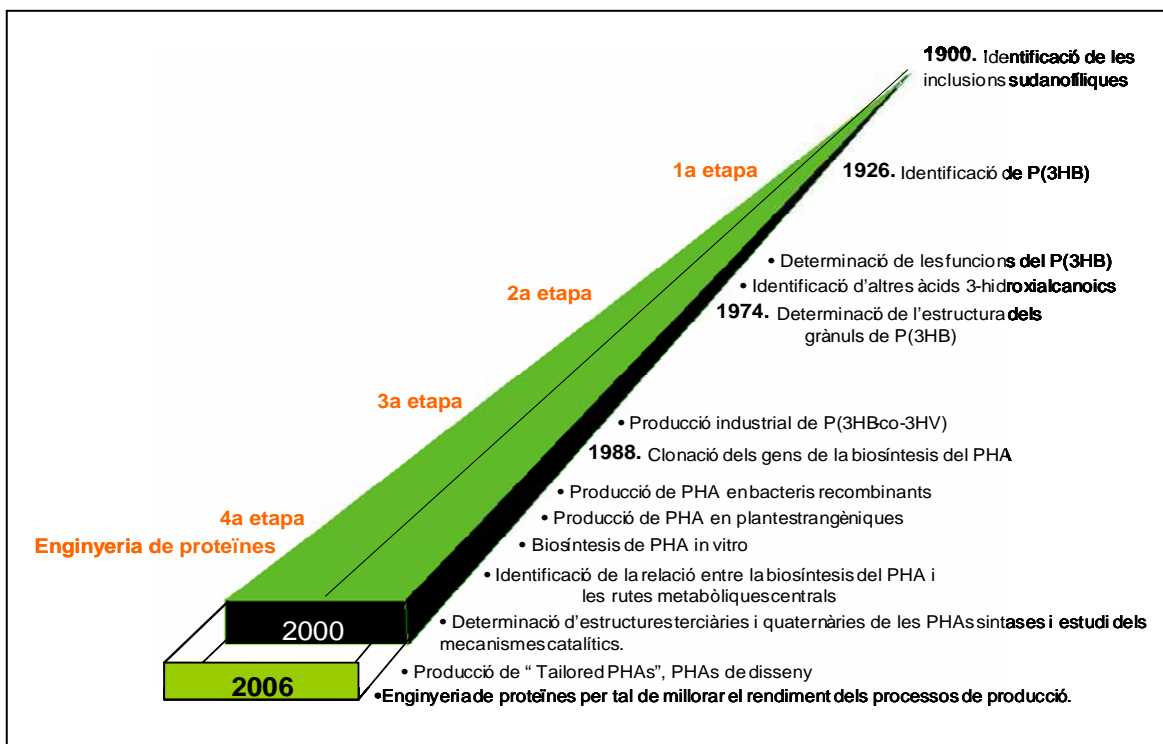
Arribat a aquest punt ja es sabia que no només els bacteris grampositius i gramnegatius podien emmagatzemar aquests polímers intracel·lulars sinó que també una gran varietat de microorganismes podien sintetitzar i acumular PHA a partir de diferents tipus de font de carboni. En el cas dels bacteris poden acumular grans quantitats de polímer, entre el 30 % i el 90 % del seu pes cel·lular sec .

La necessitat de desenvolupar polímers nous amb propietats específiques, així com els avenços recents en el camp de l'enginyeria metabòlica conjuntament amb el millor coneixement del genoma i la bioinformàtica han obert nous camins en l'estudi de noves rutes metabòliques (Steinbüchel, 2001). Aquest fet, no tan sols amplia el rang de substrats útils i per tant la producció de PHAs de disseny sinó que també implica una millora en els rendiments dels processos industrials per la producció de PHAs, quan s'utilitzen microorganismes recombinants.

El cost del PHA emprant una sòcia salvatge com per exemple *R. eutropha* és de 16\$US per Kg, és a dir, és 18 vegades més car que el cost de producció del polipropilè. En canvi emprant una sòcia d'*E.coli* recombinant s'aconsegueix reduir el cost fins a 4\$US per Kg. Aquest preu està en el rang d'altres materials plàstics biodegradables com el PLA i els polièsters alifàtics. Un cost acceptable en la producció de biopolímers és el de 3-5\$US per Kg (Lee, 1996)

En la Figura 1.1 es mostra esquemàticament l'estat de l'evolució en l'estudi, desenvolupament i producció dels polihidroxicanoats:





**Figura 1.1.** Esquema modificat de l'evolució de la ciència i tecnologia al voltant dels PHAs al llarg del s. XX, d'acord amb Sudesh *et al.*, 2000 (Sudesh *et al.*, 2000).

Així doncs, en termes econòmics per tal de poder implementar de forma satisfactòria sistemes de producció per a PHAs comercials, s'han d'estandarditzar les condicions dels processos fermentatius.

El preu del producte depèn directament del cost del substrat, del rendiment del procés d'acumulació respecte el substrat de partida i de l'eficiència dels processos de purificació i de formulació final del producte ("downstreams processes"), (Lee *et al.*, 1996). De tal manera, que no només són necessaris percentatges d'acumulació de PHA alts sinó també una productivitat alta (g producte/unitat de volum/unitat de temps) per a fer viable econòmicament la producció d'aquests biopolímers (De Koning, 1997a), (De Koning *et al.*, 1997b). Així doncs, alguns paràmetres que cal considerar per tal d'abaratir els costos de producció d'aquests biopolímers són:

- i) l'ús de microorganismes recombinants per tal de millorar el rendiment de producció respecte el substrat de partida.
- ii) l'ús de substrats de baix cost com poden ser residus industrials com per exemple les molasses, els olis de fregits, etc.

iii) l'estandardització i l'optimització dels processos fermentatius i dels processos de purificació i formulació del producte final.

Malgrat tot és evident doncs, que actualment el cost de producció és un obstacle a l'hora de potenciar l'ús dels PHAs en les múltiples aplicacions comercials en les que es pot utilitzar.

L'entrada dels PHAs al mercat dels productes "comodities" o primeres matèries ha estat condicionada pel seu elevat cost de producció, per la seva limitada disponibilitat però sobretot perquè malgrat les expectatives inicials no ha pogut complir amb els requisits necessaris per a substituir els plàstics d'origen petroquímic.

Inicialment el cost de producció del BIOPOL<sup>®</sup> emprant *Ralstonia eutropha* a partir de glucosa i àcid propiònic era superior a 16\$US/Kg. Indústries com Procter & Gamble intentaren reduir els costos de producció per tal de fer que els PHAs fossin més competitius respecte d'altres productes ja comercialitzats. Tot i que, Procter & Gamble aconseguiren reduir el cost de producció del Nodax<sup>®</sup> a 2.20 \$US/Kg, va parar la seva producció l'any 2006 (Philip *et al.*, 2007).

D'altra banda sembla que s'han trobat noves aplicacions per als PHAs en la indústria biomèdica ja que pot "tolerar" els alts costos de producció perquè els productes que s'obtenen són considerats d'un alt valor afegit.

### **1.2.2 Estructura i Propietats**

Els Polihidroxicanoats (PHAs) són polièsters biològics sintetitzats per nombrosos microorganismes i acumulats intracel·lularment en forma de grànuls com a reservori d'energia i de font de carboni. El nombre i la mida d'aquests grànuls depèn de cada microorganisme (Anderson and Dawes, 1990).

Aquest fenomen, sovint, està associat a un excés de la font de carboni i a la limitació d'algun altre nutrient (p.e: el nitrogen, el fòsfor, etc.).

Des de l'aïllament del PHB en *B. megaterium*, s'han descrit més de 90 gèneres d'arquees i bacteris capaços de produir PHA tant en entorns aeròbics com entorns anaeròbics. A la Taula 1.3 es mostren alguns exemples de microorganismes productors de PHA, així com també alguns dels substrats emprats.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, els PHAs són compostos de reserva de carboni i d'energia que múltiples microorganismes acumulen intracel·lularment en condicions subòptimes de cultiu.

Gènere	PHA % (p/p)	substrat inicial
<i>Acinetobacter</i>	<1	Glucosa
<i>Aphanothece</i>	<1	NS
<i>Aquaspirillum</i>	ND	NS
<i>Azospirillum</i>	57	3-hidroxibutirat
<i>Axobacter</i>	73	Glucosa
<i>Bacillus</i>	25	Glucosa
<i>Beggiatoa</i>	57	Acetat
<i>Beijerinckia</i>	38	Glucosa
<i>Caulobacter</i>	36	Glucosa/ glutamat/extracte de llevat
<i>Chloroflexus</i>	<1	Extracte de llevat/glicilglicina
<i>Chlorogloea</i>	10	Acetat/CO <sub>2</sub>
<i>Chromatium</i>	20	Acetat
<i>Chromobacterium</i>	37	Glucosa/peptona
<i>Clostridium</i>	13	Priptona/glucosa/extracte de llevat
<i>Derxia</i>	26	Glucosa
<i>Ectothiorhodospira</i>	ND	NS
<i>Escherichia</i>	ND	Priptona/glucosa/extracte de llevat
<i>Gammosphaeria</i>	ND	ND
<i>Haemophilus</i>	ND	Infusió de cor i cervell (BHI)
<i>Halobacterium</i>	38	Glucosa
<i>Hyphomicrobium</i>	ND	Metanol, glucosa
<i>Lamprocystis</i>	ND	NS
<i>Lampropedia</i>	ND	NS
<i>Leptothrix</i>	67	Piruvat
<i>Methylobacterium</i>	47	Metanol, glucosa
<i>Methylocystis</i>	70	Metà
<i>Methylosinus</i>	25	Metà
<i>Micrococcus</i>	28	Pentona/Triptona
<i>Microcoieus</i>	<1	NS
<i>Microcystis</i>	ND	ND
<i>Moraxella</i>	ND	NS
<i>Mycoplana</i>	ND	Metanol
<i>Nitrobacta</i>	ND	NS
<i>Nitrococcus</i>	ND	NS
<i>Nocardia</i>	14	Butà
<i>Oceanospirillum</i>	ND	NS
<i>Paracoccus</i>	ND	NS
<i>Photobacterium</i>	ND	NS
<i>Pseudomonas</i>	67	Metanol
<i>Ralstonia</i>	96	Glucosa
<i>Rhizoibum</i>	57	Metanol
<i>Rhodobacter</i>	60	Acetat
<i>Rhodospirillum</i>	47	Acetat
<i>Sphaerotilus</i>	45	Glucosa/peptona
<i>Spirillum</i>	40	Lactat
<i>Spirulina</i>	6	CO <sub>2</sub>
<i>Streptomyces</i>	4	Glucosa
<i>Syntrophomonas</i>	30	Crotonat
<i>Thiobacillus</i>	ND	Glucosa
<i>Thiocapse</i>	ND	NS
<i>Thiocystis</i>	ND	NS
<i>Thiodictyon</i>	ND	NS
<i>Thiopedia</i>	ND	NS
<i>Thiosphaera</i>	ND	Acetona,CO <sub>2</sub>
<i>Vibrio</i>	ND	NS
<i>Xanthobacter</i>	ND	NS
<i>Zoogloea</i>	ND	extracte de llevat/àcids de casamino

**Taula 1.3.** Microorganismes productors de PHA i els seus corresponents percentatges d'acumulació de PHA. On ND (S): No detectat (seleccionat) (Kim and Lenz, 2001).

Recentment s'ha demostrat que els PHAs també tenen una funció ecològica, els bacteris utilitzen els PHAs per millorar la tolerància i la supervivència en condicions culturals d'estrès. Per tal de sobreviure en ecosistemes pobres en nutrients, els bacteris han adoptat diferents estratègies, una de les quals és la d'acumular PHAs com a reservoris de carboni. Diferents estudis han demostrat que les cèl·lules amb un contingut alt de PHA sobreviuen més temps que no pas les que tenen un contingut de PHA baix ja que els PHAs poden ser degradats, assimilats i utilitzats ràpidament en nombrosos processos metabòlics.

L'acumulació de PHA proporciona a la cèl·lula una major resistència en front de condicions tant d'estrès físic com d'estrès químic. Sembla que aquest fet pot estar relacionat directament a la mateixa presència del polièster o bé a diferents fenòmens que tenen lloc simultàniament amb la degradació del PHA i l'expressió dels gens involucrats en la protecció de la cèl·lula contra agents nocius.

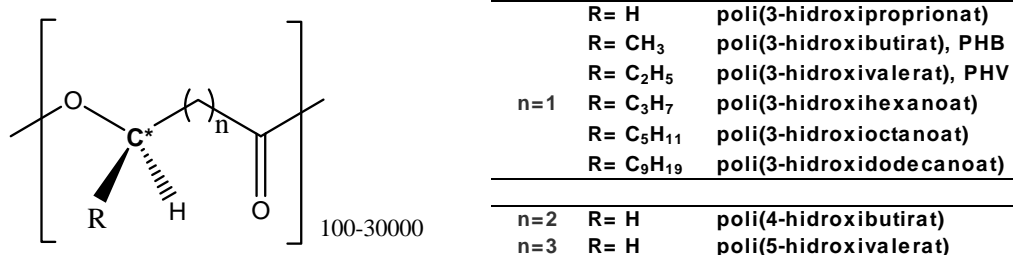
Algunes de les funcions descrites per als PHAs són les de la protecció física de la cèl·lula per evitar així el dany cel·lular i que inclou també l'ús del PHA com a font de carboni en condicions limitants d'algun nutrient. Una segona funció és la de l'ús del PHA com a font de poder reductor. Aquest poder reductor pot ser emprat per activar algunes reaccions en situació d'estrès tals com l'osmoregulació o els mecanismes de reparació ATP-depenents. En ambdós casos, el funcionament normal del cicle de PHA pot permetre el manteniment òptim de les funcions metabòliques (incloent la fixació de nitrogen i la quimiotaxis) en condicions subòptimes.

D'aquesta manera no només permet la supervivència de la cèl·lula sinó que també la proliferació cel·lular. A més a més les anàlisis filogenètiques de les proteïnes relacionades al metabolisme del PHA evidencien que l'acumulació de PHA és un factor important per a la supervivència d'alguns bacteris en el seu entorn, és a dir, l'acumulació del PHA confereix a les cèl·lules una avantatge ecològica (Kadouri *et al.*, 2005).

Els Polihidroxicanoats (PHAs) són polièsters biològics, òpticament actius ja que tots els monòmers presenten un estereocentre de configuració (R) com a conseqüència de l'alta estereoespecificitat dels enzims biosintètics (Anderson and Dawes, 1990), (Lee *et al.*, 1996).

Aquest biopolímers poden estar constituïts per una gran diversitat d'àcids hidroxialcanoics (HA). L'estructura química general dels quals es mostra a continuació a la Figura 1.2.

La majoria dels PHA's coneguts són polímers de 3-hidroxiàcids (3-HAs). Tot i que no és habitual també s'han trobat monòmers hidroxilats en posició 2,4,5 i 6 (Kunioka *et al.*, 1989), (Valentin *et al.*, 1996), (Valentin *et al.*, 2000), (Valentin *et al.*, 1994), (Eggink *et al.*, 1995).



**Figura 1.2.** Estructura química de les diferents unitats de repetició dels PHAs on s'observa el centre quiral (\*) amb configuració (R) per a tots els monòmers del polímer. En funció de la longitud de les cadenes laterals, R, els PHAs es classifiquen com a : scl-PHA, PHAs de cadena curta on R= CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; mcl-PHA, PHAs de cadena mitja on R=C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> -C<sub>11</sub>H<sub>23</sub> ; lcl-PHA, PHAs de cadena llarga on R>C<sub>11</sub>.

En funció de la longitud de les cadenes monomèriques, els PHAs es classifiquen en tres tipus: scl-PHAs, mcl-PHAs i els lcl-PHAs.

- PHAs de cadena curta o scl-PHAs (short chain length-PHAs), contenen entre 3-5 àtoms de carboni. Els més coneguts són el PHB i el seus copolímers amb el polihidroxi valerat (PHB-co-PHV). De llarg, el PHB és el PHA més comú en la natura. Com a conseqüència de la síntesi enzimàtica, el PHB té una regularitat estereoquímica excepcional. Les cadenes són completament lineals i tots els estereocentres presenten configuració R, per la qual cosa aquest polímer és isotàctic. En canvi els seus copolímers amb 3HV, s'ha demostrat mitjançant estudis de ressonància magnètica nuclear (RMN), que són polímers aleatoris (copolímers "random") (Akita *et al.*, 1976), (Fernandez del Castillo *et al.*, 1986), (Kunioka *et al.*, 1989), (Steinbüchel and Schubert, 1989),

(Steinbüchel and Wiese, 1992), (Park *et al.*, 1995), (Kim and Chang, 1998), (Choi and Lee, 1999), (Kim, 2000), (Zinn, 2003).

- PHAs de cadena mitja o mcl-PHAs (medium chain length-PHAs), aquests polímers contenen cadenes de 6-14 àtoms de carboni. En general s'obtenen copolímers aleatoris amb longituds de cadena variables i que depenen de l'estructura química del substrat de partida (Huijberts *et al.*, 1992), (Lenz *et al.*, 1992), (Steinbüchel and Wiese, 1992), (Preusting *et al.*, 1993), (De Koning, 1995), (Steinbüchel and Valentin, 1995), (Cromwick *et al.*, 1996), (Lee *et al.*, 1999), (Witholt and Kessler, 1999), (Fernández *et al.*, 2005), (Bassas *et al.*, 2006).
- PHAs de cadena llarga o lcl-PHAs (long chain length-PHAs), aquest grup és el menys abundant i les seves cadenes contenen més de 15 àtoms de carboni. Fins a aquest moment no s'ha trobat cap referència bibliogràfica dels PHAs de cadena llarga.

La diferent longitud i composició de les cadenes laterals, així com també el fet que siguin susceptibles de modificar-se químicament *a posteriori* fa que aquests polímers tinguin un ampli ventall d'aplicacions potencials.

Els PHAs són considerats bons candidats com a materials polimèrics biodegradables ja que presenten propietats semblants a alguns termoplàstics i elastòmers d'origen sintètic molt emprats (des de el polipropilè fins a les gomes sintètiques) i a més poden ésser degradats completament a diòxid de carboni i aigua (o metà en condicions anaeròbiques) per diferents microorganismes en diferents entorns (sòls, aigües marines o dolces, fangs residuals, etc.). Així doncs, com a conseqüència de la seva biodegradabilitat i biocompatibilitat, presenten potencialment una gran diversitat d'aplicacions industrials. Les propietats dels PHAs depenen de la seva composició monomèrica i aquesta depèn del tipus de microorganisme i de la font emprada com a substrat.

En general cada soca bacteriana només es capaç de sintetitzar un sol tipus de PHA degut a l'alta especificitat de l'enzim PHA-sintasa. S'ha descrit, per exemple, que

les espècies *Alcaligenes latus*, *Ralstonia eutropha*, *Rhodospirillum rubrum* i *Azotobacter vinelandii*, només sintetitzen PHAs de cadena curta (Anderson and Dawes, 1990), (Lee, 1996). D'altra banda, existeix un extens grup de bacteris gramnegatius, on cal destacar el gènere *Pseudomonas*, que es caracteritzen per a sintetitzar PHAs de cadena mitja (Bassas *et al.*, 2006), (Huisman *et al.*, 1989), (Huijberts and Eggink, 1996), (Huijberts *et al.*, 1992), (Hartmann *et al.*, 2004), (Solaiman *et al.*, 1999), (Fernández *et al.*, 2005). Malgrat l'especificitat de la PHA-sintasa s'han descrit casos on un microorganisme és capaç de produir PHAs de diferents tipus quan es alimentat amb diferents substrats (Fukui *et al.*, 1998).

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, l'altre factor que condiciona la composició monomèrica del polímer és la font de carboni que s'utilitza per a alimentar els cultius.

Per tal d'obtenir nous biopolièsters amb propietats fisicoquímiques diferents, s'han provat diferents tipus de substrats com per exemple: hidrocarburs, àcids grassos de cadena mitja i curta, glucosa o d'altres fonts de carboni amb grups funcionals susceptibles de ser modificats químicament (per tal d'obtenir d'altres polímers d'interès, ja siguin polímers biodegradables o biomaterials funcionals amb aplicacions biomèdiques).

D'altres fonts de carboni emprades són els residus industrials (residus oleaginosos, melasses, olis de fregits, etc.) amb l'objectiu de millorar els costos dels processos de producció (Fernández *et al.*, 2005), (Du and Yu, 2002), (Garcia-Ribera *et al.*, 2001), (Page, 1992), (Yu *et al.*, 1998).

El fet que sigui materials biodegradables, els fa atractius per un ampli ventall d'aplicacions industrials, malgrat tot, actualment no poden competir en front dels plàstics convencionals (derivats del petroli) degut al seu alt cost de producció. Però en canvi, la seva biocompatibilitat fa que siguin productes d'alt valor afegit i bons candidats per a les aplicacions biomèdiques.

#### ❖ *Pes molecular dels PHAs*

El pes molecular dels PHAs purificats depèn dels processos biotecnològics i de les condicions del processat final de la mostra. Els mecanismes que afecten i per tant determinen el pes molecular d'aquests polímers en les cèl·lules bacterianes són encara bastant desconeguts. Malgrat tot, el pes molecular depèn del tipus de microorganisme i del tipus de font de carboni emprada. D'altres paràmetres que semblen jugar un paper

important en la síntesi del polímers bacterians són el temps de producció i en quin moment del cicle de creixement del microorganisme s'acumula.

El pes molecular en massa ( $M_w$ ) del PHB oscil·la entre 600000 i  $>1000000$  g/mol amb un índex de polidispersitat al voltant de 1,9. Aquests valors són molt superiors als obtinguts per a polièsters sintètics. Per als copolímers de HB amb 3HV s'obtenen copolímers amb pesos moleculars més baixos però en canvi la distribució de pesos moleculars, és a dir, l'índex de polidispersitat és considerablement superior ( $M_w/M_n \approx 4$ ), d'acord amb la Taula 1.4.

**Taula 1.4.** Propietats polimèriques de diferents tipus de PHAs saturats i insaturats. On  $T_g$  és la temperatura de transició vítria;  $T_m$  és la temperatura de fusió;  $M_w$ , és el pes molecular en massa i el quocient  $M_w/M_n$ , (el quocient entre el pes molecular en massa i el pes molecular en nombre) representa l'índex de polidispersitat, (van der Walle *et al.*, 2001).

	$M_w$ (g/mol)	$M_w/M_n$	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)
<b>PHA produït per <i>A. eutrophus</i></b>				
PHB	> 1400000	1,9	9	177
Poli (3HB-co-HV) (15% mol HV)	982000	2,5	-1	140
Poli (3HB-co-HV) (28% mol HV)	930000	4,0	-8	102
<b>PHA produït per <i>P. oleovorans</i></b>				
<b>emprant com a font de carboni:</b>				
n-hexà	330000	1,8	-25,8	-
n-octà	178000	1,8	-36,5	58,5
n-decà	225000	2,0	-38,4	47,6
1-octè	242000	2,4	-36,6	-
1-decè	260000	2,2	-43,1	-
<b>PHA produït per <i>P. oleovorans</i></b>				
<b>emprant com a font de carboni:</b>				
àcids grassos d'oli de coco	84000	1,6	-43,7	42,4
àcid oleic	112000	1,6	-56,3	-
àcids grassos d'oli de resina	56000	1,7	-59,8	-
àcids grassos d'oli de llinosa	97000	2,3	-61,7	-

No així, per als PHAs de cadena mitjana (saturats, insaturats o bé amb grups funcionals a les cadenes laterals) s'han descrit valors de pesos moleculars relativament més baixos als trobats per als PHAs de cadena curta. Els pesos moleculars per als mcl-PHAs són de 60000-360000 g/mol (van der Walle *et al.*, 2001). Els índexs de polidispersitats oscil·len entre 1,6 i 2,4. Aquests valors de distribució de pesos moleculars són molt propers al valor teòric ( $M_w/M_n=2$ ) dels polímers sintètics policondensats com són els polièsters sintetitzats químicament.



❖ *Propietats tèrmiques dels PHAs*

La majoria dels PHAs són polímers parcialment cristal·lins i per tant les seves propietats tèrmiques i mecàniques s'expressen normalment en funció de la temperatura de transició vitrea ( $T_g$ ) per a la fase amorfa i amb la temperatura de fusió ( $T_m$ ) per a la part cristal·lina del material.

Els scl-PHA (p.e: PHB i el PHB-co-PHV) són polímers termoplàstics, que són fluids moldejables per sobre la  $T_m$ , en canvi els mcl-PHAs són generalment elastòmers amb punts de fusió molt baixos.

Els mcl-PHAs són polímers pràcticament amorfs en la seva totalitat amb una temperatura de transició vitrea per sota de la temperatura ambient ( $T_g$  -62 a -26°C) i amb una temperatura de fusió relativament baixa ( $T_m$ - 42-58°C) (Van der Walle *et al.*, 1999), (Casini *et al.*, 1997), (Preusting, 1990). Per tant, els mcl-PHAs poden ser considerats com elastòmers típics. La temperatura de transició vítria decreix a mesura que augmenta el promig de la longitud de les cadenes laterals ja que aquestes es fan més mòbils. A més a més a l'augmentar la diversitat de les cadenes dins d'un mateix polímer en dificulta la seva cristal·lització. Aquesta és la raó per la qual els mcl-PHAs cristal·litzen molt lentament, especialment en els casos d'alguns copolímers, on el procés de cristal·lització no s'observa i per tant tampoc la  $T_m$ .

❖ *Biodegradació dels PHAs*

D'altra banda la característica que diferencia els PHAs i possiblement la seva gran avantatge respecte els plàstics convencionals (petroplàstics) és la seva biodegradabilitat (Boopathy, 2000), (Reddy *et al.*, 2003). Els PHAs poden ser degradats tèrmicament o per hidròlisi enzimàtica. En sistemes biològics, aquests polímers poden ser degradats emprant depolimerases microbianes o en el cas específic de teixits animals poden ser hidrolitzats (enzimàtica o no enzimàticament) (Gogolewski *et al.*, 1993), (Philip *et al.*, 2007). En el cas del PHA, la seva biodegradabilitat depèn de les propietats físiques i químiques, és a dir, tant l'estructura química (la naturalesa de les unitats monomèriques i el balanç hidrofílic/hidrofòbic), com el grau de cristal·linitat són factors molt importants en els processos de biodegradació (Lee, 1996). S'ha vist que PHAs amb baix pes molecular són més susceptibles de ser biodegradats. De la mateixa manera s'ha trobat una relació entre la temperatura de fusió ( $T_m$ ) i el procés de degradació. A mesura que augmenta la  $T_m$ , la biodegradabilitat disminueix. Tokiwa i Suzuki (1977) descobriren que les lipases no poden hidrolitzar el P(3HB), possiblement degut a la seva

alta temperatura de fusió ( $T_m=178\text{ }^\circ\text{C}$ ) i a la seva elevada cristal·linitat (Tokiwa and Suzuki, 1977).

La població microbiana així com la temperatura en un entorn determinat també poden contribuir a la biodegradació d'aquests polímers. Estudis realitzats per (Johnstone, 1990) i (Flechter, 1993) han demostrat que pràcticament un 85 % del PHA pot ser degradat en set setmanes. Pel que fa en ambients aquàtics, (Johnstone, 1990) en un estudi realitzat en el Llac de Lugano (Suïssa), demostrà que en 254 dies i a temperatures que no superen els  $6\text{ }^\circ\text{C}$ , el PHA es degradat completament.

### **1.2.3 Aplicacions potencials i/o aplicacions reals dels PHAs**

En els darrers anys, el nombre de publicacions científiques en l'estudi del PHA (biosíntesi, producció (bioreactors) i caracterització) ha augmentat considerablement. L'estudi dels PHAs va començar com un tema d'interès purament acadèmic, s'ha convertit d'interès comercial possiblement degut al seu llarg rang d'aplicacions.

Els PHAs són materials termoplàstics no tòxics, biocompatibles i biodegradables que poden ser produïts a partir de fonts renovables i/o de residus industrials. Algunes característiques són un alt grau de polimerització, poden ser cristal·lins o amorfs en funció de la composició, tenen activitat òptica, i en alguns casos com el PHB són isotàctics (presenten una estereoquímica molt regular en les seves unitats de repetició). També són piezoelèctrics i insolubles en aigua. Aquestes són algunes de les característiques que els fan molt competitiu amb el polipropilè.

Els PHAs tenen un ampli ventall d'aplicacions gràcies a les seves múltiples característiques, tan a nivell industrial, biomèdic o en el camp de l'agricultura. Inicialment, els PHAs s'utilitzaven en la producció d'articles d'ús quotidià com a components de bosses, envasos i com a recobriments en papers, és a dir, s'utilitzaven per aplicacions molt similars a les dels plàstics convencionals. El primer producte fet a partir de PHA va ser llençat al mercat a l'abril del 1990 per Wella AG, que va comercialitzar una línia de xampús ecològics envasats en ampolles fetes de Biopol (ICI, UK). Malgrat presentar propietats similars als derivats petroquímics, econòmicament encara no hi poden competir.

A més de ser emprats en usos similars als dels plàstics convencionals, cal recordar que els PHAs són materials estereoregulars, i per tant poden ser utilitzats com a precursors quirals en la síntesi química de compostos òpticament actius. Aquesta propietat fa que siguin productes amb un alt valor afegit i per tant prou competitiu

econòmicament. Aquests compostos són emprats particularment com a vehiculadors per a l'administració controlada de principis actius, drogues, hormones, insecticides i herbicides. També s'han utilitzat com a materials osteosintètics en els processos d'estimulació del creixement ossi aprofitant així les seves propietats piezoelèctriques. Altres aplicacions han estat l'ús com a discs ossis, sutures quirúrgiques i recanvis de vasos sanguinis (Reddy *et al.*, 2003). Malgrat tot, les aplicacions en el camp de la biomedicina i a la indústria farmacèutica són limitades ja que aquest biopolímers tenen una biodegradació lenta i a la vegada una alta estabilitat hidràulica en teixits estèrils (Wang and Bakken, 1998).

Els PHAs són utilitzats com a precursors en la síntesi de compostos quirals (productes de síntesi enantiomèricament purs) i com a productes base per a la producció de pintures. Els PHAs poden ser fàcilment hidrolitzables per a l'obtenció d'hidroxiàcids purs òpticament actius (Ren *et al.*, 2005). Per exemple Merck hidrolitza el PHB per a l'obtenció de l'àcid (R)-3-hidroxi-butíric que s'utilitza en la síntesi d'un fàrmac antiglaucoma (Truspot®). L'àcid (R)-3-hidroxi-butíric conjuntament amb el (R)-1,3-butanediol també és utilitzat en la síntesi de  $\beta$ -lactames.

En el cas dels èsters dels  $\beta$ -hidroxiàcids i els seus derivats també són considerats com a "solvents verds", és a dir, com una alternativa neta als dissolvents clàssics.

Els PHAs comercials més coneguts són el Biopol® (copolímer de PHB-co-PHV), el Nodax® (copolímer de PHB-co-mclPHA) i el DegraPol® (copolímer de bloc de polièster-uretà, sintetitzat a partir del PHB-diol) (Philip *et al.*, 2007).

### ❖ *Biopol®*

Inicialment el Biopol® era produït per ICI, però actualment és manufacturat per Metabolix (Cambridge, MA, USA). Aquest copolímer de poli(3HB-co-3HV) és un termoplàstic que presenta una temperatura de fusió entre 140-180 °C. Si s'augmenta el percentatge de 3HV, el polímer esdevé més elàstic. Aquest polímer ha estat emprat per a la producció de recobriments en papers, el la producció de films, cordes i xarxes de pescar, envasos, etc. Empreses com Fluka i Toray estan intentant desenvolupar un derivat del Biopol® per a finalitats biomèdiques. Actualment, el Biopol® és emprat en la producció d'ampolles de xampú, ampolles d'oli de motors i en la producció de maquinets d'afaitar.

❖ *Nodax*®

El Nodax® és un copolímer de 3HB i un mcl-PHA (com per exemple el 3-hidroxihexanoate, 3HHx; 3-hidroxi octanoat, 3HO; o el 3-hidroxidecanoat; 3HD). L'avantatge d'incorporar un mcl-PHA al PHB és la disminució de la cristallinitat i de la temperatura de fusió ( $T_m$ ), que fa que el copolímer sigui un material més tou i més dúctil, i per tant un material amb noves aplicacions comercials. Aquest polímer ha estat desenvolupat per Procter & Gamble i algunes de les seves característiques són la degradació aeròbica i anaeròbica, estabilitat hidrolítica i propietats mecàniques i elàstiques modulables. El Nodax® pot ser emprat en la producció de vestits quirúrgics, catifes, envasos, bosses de compostatge.

❖ *DegraPol*®

Aquest biopolímer és un polímer de bloc de polièster-uretà sintetitzat químicament a partir del P(3HB)-diol i de  $\alpha,\omega$ -dihidroxipoli( $\epsilon$ -caprolactona-bloc-dietilenglicol-bloc- $\epsilon$ -caprolactona). Les aplicacions més interessants han estat descrites en el camp de la biomedicina, especialment en el tractament per a la cicatrització d'ossos.

#### 1.2.4 Biosíntesi dels PHAs: rutes metabòliques

L'estudi del metabolisme, la bioquímica i la fisiologia del PHB des del 1987 complementats amb estudis genètics recents han aportat molta informació de les rutes metabòliques de la biosíntesi de PHA. S'han clonat i caracteritzat múltiples gens que codifiquen els enzims que participen tant en la biosíntesi com en la degradació del PHA per diferents microorganismes. Així doncs, s'ha demostrat que la natura ha desenvolupat diferents rutes per a la síntesi del PHAs, que s'ajusten als diferents nínxols ecològics per als microorganismes productors de PHA (Reddy *et al.*, 2003).

D'altra banda, els estudis genètics també han proporcionat informació sobre la regulació de les rutes biosintètiques del PHA respecte les condicions culturals i han demostrat el paper bàsic que realitzen en el metabolisme central i en la fisiologia cel·lular (Madison and Huisman, 1999). Amb la descoberta als anys 80s de diferents HAs diferents al HB com a components dels PHAs va quedar palès l'ampli rang d'especificitat de substrat dels enzims PHA-sintases i per tant la gran varietat de monòmers que poden ser polimeritzats.

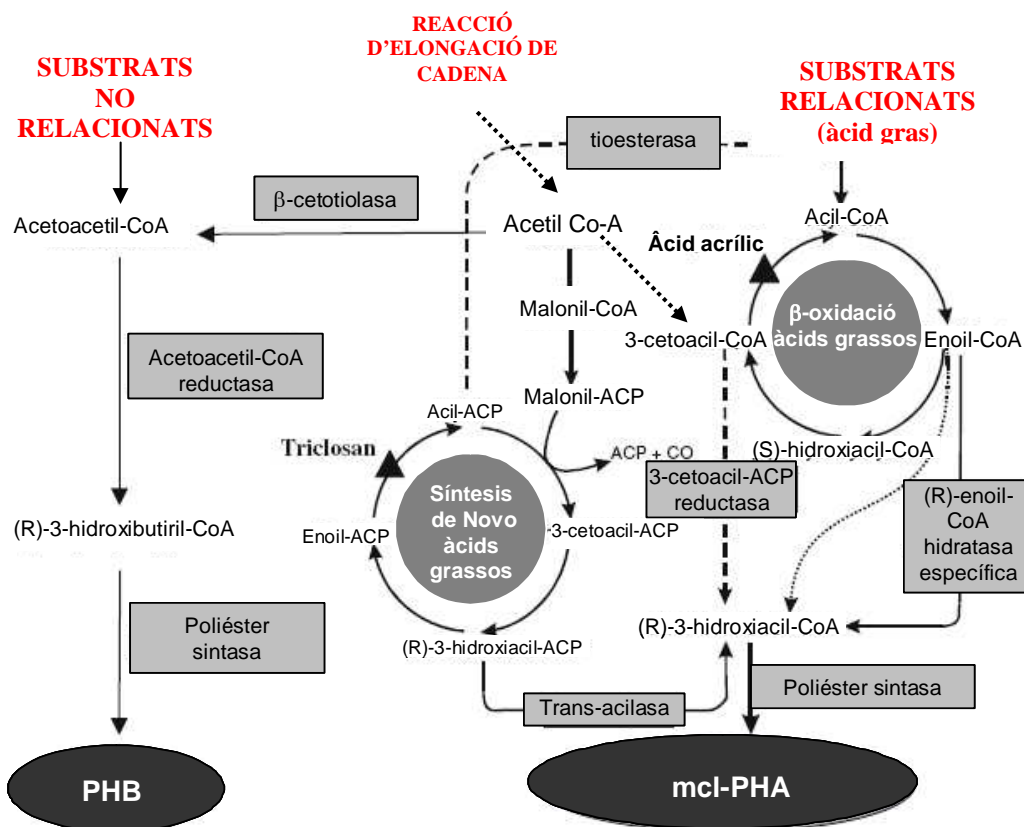
Tal i com s'ha comentat anteriorment, la composició monomèrica del polímer depèn de diferents factors com són el tipus de microorganisme productor de PHA ( i per tant del tipus de PHA-sintasa), de la font de carboni escollida com a substrat i finalment de les rutes metabòliques implicades en la síntesi del polímer. La ruta metabòlica per a la síntesi de PHA es veu influenciada directament per a la font de carboni emprada.

En funció del tipus de microorganisme productor de PHA, s'han descrit quatre tipus diferents de rutes metabòliques principals (Figura 3):

- i. Ruta de *Ralstonia eutropha*, aquesta és la ruta metabòlica per a la síntesi de PHB i consta de tres reaccions enzimàtiques catalitzades per tres enzims diferents. La primera reacció és una condensació de dues molècules de acetilcoenzim A (acetil CoA) a acetoacetil-CoA per acció de la  $\beta$ -cetoacilCoA tiolasa. La segona reacció és la reducció de l'acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA mitjançant el NADPH-acetoacil-CoA deshidrogenasa. I finalment té lloc la polimerització dels monòmers de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA a P3HB per acció de la P(3HB) polimerasa (Huisman *et al.*, 1989).
- ii. Ruta de *Rhodopseudomonas rubrum*: Aquesta ruta és un cas particular de la ruta descrita anteriorment per *R. eutropha*. En aquesta cas, l'acetoacetil-CoA és reduït mitjançant una reductasa/NAPH a (S)-(+)-3-hidroxi-butiril-CoA que posteriorment per acció dues enoil-CoA hidratases és convertit al (R)-(-)-hidroxi-butiril-CoA.
- iii. Ruta de *Pseudomonas* del grup I d'homologia rRNA: En aquest tercer tipus de rutes metabòliques hi trobem un gran nombre d'espècies de *Pseudomonas* com *P. oleovorans*, *P. aeruginosa* i *P. putida*. En aquests cas aquestes espècies acumulen PHA format per hidroxi-alcanoats de cadena mitja (mcl-PHAs) (De Smet *et al.*, 1983), (Lageveen *et al.*, 1988).
- iv. Ruta de *Pseudomonas* del grup II d'homologia rRNA: Aquesta ruta és emprada per *P. cepacia* (*Burkholderia cepacia*) implica la síntesi de copolièsters de 3HAs de cadena mitja (mcl-PHAs) a partir de l'acetil-CoA. Encara es desconeixen bastant detalls dels mecanismes de reacció d'aquesta ruta.

Així doncs, de manera general, la biosíntesi bacteriana de PHAs es pot dividir en dos tipus: la biosíntesi de scl-PHAs i la biosíntesi de mcl-PHAs.

Tal i com es pot observar en l'esquema de la Figura 1.3, la biosíntesi de PHB (scl-PHA) comença amb la condensació de dues molècules d'acetil-CoA. Aquesta reacció està catalitzada per la  $\beta$ -cetotiolasa (PhaA) donant lloc a la formació de l'acetoacetil-CoA que seguidament és reduït a (R)-3-hidroxiacetil-CoA per la (R)-acetoacetil-CoA reductasa específica (PhaB). Finalment el (R)-3-hidroxiacetil-CoA és el substrat per la polièster sintasa (PhaC) i precursor directe de la biosíntesi de PHB (Rehm, 2006).



**Figura 1.3.** Diagrama de les rutes metabòliques en la biosíntesi de scl-PHA i mcl-PHA. Els enzims estan indicats amb requadres grisos i els triangles indiquen inhibidors de la ruta metabòlica per a la síntesi de biopolièsters. Esquema adaptat de (Rehm, 2006).

En canvi, per el cas dels mcl-PHAs, els (R)-3-hidroxiàcids de cadena mitja són sintetitzats a partir de la conversió d'intermediaris del metabolisme dels àcids grassos a (R)-3-hidroxiacetil-CoA. En el cas de les *Pseudomonas* s'han descrit fins a tres vies possibles per a la síntesi de (R)-3-hidroxiacetil-CoA que són els substrats per a les

polièster sintases (Rehm *et al.*, 1998), (Fiedler *et al.*, 2002): **(i)  $\beta$ -oxidació**, és la ruta principal quan s'utilitzen àcids grassos com a font de carboni, **(ii) La síntesi *de novo* d'àcids grassos**, els substrats no relacionats són metabolitzats a acetil-CoA (p.e: etanol, glucosa, acetat, etc.) i **(iii) La reacció d'elongació de cadena**, en aquesta ruta s'obté el (R)-3-hidroxiacil-CoA a partir de la condensació de dues molècules d'acetil-CoA.

Així doncs, Lageveen *et al.* (1988), van demostrar que la composició monomèrica dels mcl-PHAs (saturats i linials) produïts per *P.oleovorans* depenia del tipus de n-alcà emprat com a substrat (Lageveen *et al.*, 1988). Els n-alcans eren degradats mitjançant la pèrdua de dues unitats de CH<sub>2</sub>, per tant, semblava que la via implicada en la biosíntesi del polímer era la  $\beta$ -oxidació. Posteriorment, Preusting *et al.*, confirmaven els resultats obtinguts per Lageveen *et al.* a més però, suggeria que podien haver-hi d'altres vies metabòliques implicades en la biosíntesi d'aquests polímers, ja que quan s'emprava l'àcid hexanoic com a substrat, en la composició polimèrica del mcl-PHA es detectava 3-hidroxi octanoat i el 3-hidroxi decanoat (Preusting *et al.*, 1990).

S'obtingueren resultats semblants treballant amb *P.putida* KT2442 i emprant àcids grassos com a substrats. Estudis realitzats amb l'àcid decanoic marcat amb <sup>13</sup>C i inhibidors de la  $\beta$ -oxidació i de la síntesi *de novo* dels àcids grassos van demostrar que la producció de mcl-PHAs emprant l'àcid decanoic com a substrat només podia tenir lloc via  $\beta$ -oxidació. En canvi, estudis realitzats emprant l'àcid hexanoic marcat amb <sup>13</sup>C demostraven que en la biosíntesi de polímer hi havia implicades tres vies metabòliques diferents. L'àcid hexanoic podia ser incorporat directament en els poli(3HA) en forma d'àcid 3-hidroxi hexanoic després de mig cicle de la  $\beta$ -oxidació. A més a més, l'àcid hexanoic podia ser parcial o totalment degradat en la  $\beta$ -oxidació a acetil-CoA per posteriorment ser incorporat a la via de síntesi *de novo* d'àcids grassos i formar monòmers amb diferents longituds de cadena (C6-C14). L'existència de monòmers d'àcid 3-hidroxi octanoic indicava que la reacció d'elongació de cadena també tenia lloc.

Actualment, *P. oleovorans* i *P. putida* són les espècies de *Pseudomonas* productores de PHA més estudiades. Quan es fa créixer *P. oleovorans* amb n-alcans i limitació de font de nitrogen, la composició monomèrica del PHA que es sintetitza és similar al substrat emprat. Així doncs, el monòmer de cadena més llarg contindrà el

mateix nombre d'àtoms de carboni que la font de carboni inicial. Si es treballa amb substrats amb un nombre senar d'àtoms de carboni és d'esperar que els monòmers del polímer també tinguin un nombre senar d'àtoms de carboni. I de la mateixa manera, quan es treballa amb substrats amb un nombre parell d'àtoms de carboni, els monòmers esperats també tindran un nombre parell d'àtoms de carboni (Zinn *et al.*, 2001).

La majoria de *Pseudomonas* que pertanyen al grup I d'homologia rRNA a excepció de *P. oleovorans* poden sintetitzar mcl-PHA a partir de substrats no relacionats com per exemple el gluconat, fructosa, acetat, glicerol i lactat (Anderson and Dawes, 1990). El PHA sintetitzat a partir d'aquests substrats conté principalment monòmers de 3-hidroxidecanoat. En aquests cas, els monòmers 3-hidroxiacil s'obtenen a partir de la ruta de síntesi *de novo* dels àcids grassos. D'altres espècies de *Pseudomonas* que utilitzen aquesta via metabòlica són *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. citronellolis*, *P. mendocina* i *P. putida*. Si l'intermediari de la biosíntesi d'àcids grassos és (R)-3-hidroxiacil-ACP, es necessita d'un altre pas biosintètic per a convertir-lo en (R)-3-hidroxiacil-CoA que és el precursor de la PHA-sintasa. Sembla ser que el connector entre la biosíntesi d'àcids grassos i la síntesi *de novo* és un enzim (PhaG) que presenta activitat (R)-3-hidroxiacil-CoA-ACP transferasa. Algunes espècies de *Pseudomonas* són capaces de sintetitzar 3HB i mcl-PHA simultàniament a partir de diferents tipus de fonts de carboni. Les anàlisis de TEM amb criofractura han demostrat que els dos tipus de polímers són emmagatzemats en grànuls diferents (Fukui *et al.*, 1998). Estudis genètics han demostrat que aquestes espècies de *Pseudomonas* tenen almenys dos tipus diferents de PHA-sintases amb diferent especificitat de substrat (Timm *et al.*, 1994).

Els àcids grassos de cadena llarga, com per exemple l'àcid oleic o l'àcid linoleic, també són bons substrats per a la producció de mcl-PHA. D'acord amb De Waard *et al.*, (1993) l'àcid oleic és degradat per la via enoil-CoA isomerasa depenent per tal de formar monòmers monoinsaturats que són incorporats als mcl-PHA. En canvi, l'àcid linoleic és degradat per la via enoil-CoA reductasa depenent, tal i com indica el fet de trobar monòmers amb dues insaturacions a les cadenes (De Waard *et al.*, 1993).

L'afinitat de la PHA-polimerasa, responsable de la reacció polimerització, difereix en funció de la longitud de cadena dels 3-hidroxiàcids. Considerant les composicions monomèriques obtingudes emprant àcids grassos o n-alcans com a substrat, s'observa una major afinitat per als 3-hidroxiàcids amb una longitud de cadena de 8,9 i 10 àtoms



de carboni. En canvi l'afinitat de l'enzim decreix amb els 3-hidroxiàcids de cadena més curta i amb els de cadena més llarga.

Així doncs, el gènere *Pseudomonas* pot sintetitzar un nombre molt divers de monòmers (R)-HA òpticament actius i permeten la introducció de grups funcionals susceptibles de ser derivatitzats químicament o bé ser utilitzats com a punts de reacció per a compostos actius, com principis actius i així tenir aplicacions biomèdiques.

### **1.2.5 Estructura i formació del grànul de PHA**

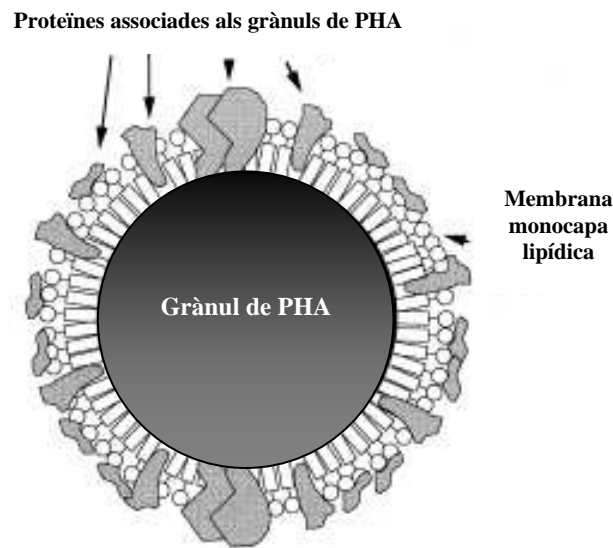
Al llarg de la última dècada s'ha fet un gran esforç en l'estudi de l'estructura del grànul de PHA, així com també en els mecanismes de formació (Peters and Rehm, 2005), (Steinbüchel *et al.*, 1995), (Kelley and Srienc, 1999). Els grànuls estan formats per una capa externa de proteïnes específiques (Stuart *et al.*, 1998) i fosfolípids (Griebel *et al.*, 1968). Aquesta capa externa recobreix el nucli del grànul format pel PHA en estat amorf.

La superfície de les inclusions de PHA (in vivo) és una regió d'unió dinàmica de les proteïnes responsables de la biosíntesi del PHA, PHA sintasa, (Gerngross *et al.*, 1993) i de la degradació o mobilitat dels reservoris polimèrics, PHA depolimerasa intracel·lular, (Handrick *et al.*, 2000). Aquestes proteïnes estan lligades covalentment a la superfície del grànul de PHA (Saegusa *et al.*, 2001).

Un altre tipus de proteïnes que es troben en la superfície de les inclusions són les fasines (proteïnes amfipàtiques) considerades les responsables de la formació i l'estabilització de les inclusions lipídiques (Pieper-Fürst *et al.*, 1994).

Aquestes proteïnes tenen una funció estructural i estan unides al nucli del grànul de forma no covalent (Hanley *et al.*, 1999). Les fasines promouen la biosíntesi del PHA i sembla ser que existeix una relació entre el nombre de fasines existents a la superfície i la mida del grànul (Pötter *et al.*, 2002), (York *et al.*, 2001). Una simulació feta amb ordinador va suggerir que l'activitat de les fasines podria influir sobre la cinètica de la formació del grànul de PHA reduïnt-ne la fase de latència (Jurasek, 2004).

Així doncs, la formació dels grànuls es veu afectada pels nivells d'activitat dels enzims associats a la biosíntesi de PHA (Jung *et al.*, 2000), per tant, sembla ser que nivells alts de la PHA sintasa i de les proteïnes fasines es tradueix en un augment en el nombre d'inclusions.



**Figura 1.4.** Model proposat per Sudesh (2002) per l'estructura del grànul de PHA in vivo. A la superfície externa del grànul s'hi troben associades les proteïnes específiques (PHA sintasa, PHA depolimerasa), les fasines, proteïnes reguladores i d'altres proteïnes amb funció desconeguda (Sudesh, 2002).

També s'han localitzat algunes proteïnes reguladores específiques de PHA (Maehara *et al.*, 2001), (Prieto *et al.*, 1999), (York *et al.*, 2002) i d'altres tipus de proteïnes sense una funció coneguda (Kinkle *et al.*, 2000).

S'han descrit dos models per a l'estructura dels grànuls de PHA, un per als bacteris productors de scl-PHA (PHB) i un altre per als bacteris productors mcl-PHA.

En el cas del model descrit per al scl-PHA en *B. megaterium*, el grànul està envoltat per una monocapa lipídica (0,5 % (p/p)) i proteïnes a la part externa a la part externa (2 % (p/p)). No s'ha pogut demostrar que ni les proteïnes ni els lípids estiguin integrats dins del grànul. En canvi, els grànuls de mcl-PHA són més grans i presenten una estructura més complexa que els descrits per als scl-PHA. Estudis de microscòpia electrònica suggereixen que la superfície del grànul consisteix en una capa fosfolipídica que separa dues capes de proteïnes cristal·lines.

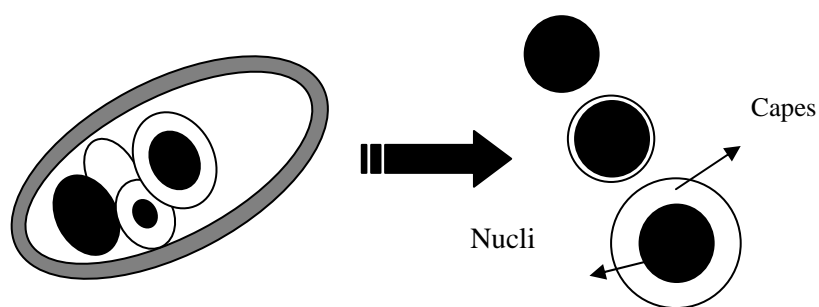
#### **1.2.5.1 Grànuls en capes**

*P. oleovorans* sintetitza, quan es fa créixer amb una barreja d'àcid 5-fenilvalèric i àcid nonanoic, un homopolièster, poli-àcid (3-hidroxi-5-fenilvaleric) (poli(3HPV)), i un copolièster d'àcid 3-hidroxinonanoic (poli-3HN) i d'altres 3HA relacionats (poli(3HN-

co-HAmcl) (Curley *et al.*, 1996). El poli(3HPV) també és sintetitzat quan s'utilitza l'àcid 5-fenilvalèric com a única font de carboni.

Quan *P. oleovorans* creix en ambdues fonts de carboni, s'observa la formació de grànuls en capes, és a dir, els grànuls presenten nucli de poli(3HN-co-HAmcl) envoltat per diferents capes de poli(3HPV). Estudis de microscòpia electrònica de transmissió i tinció amb tetròxid de ruteni han confirmat que el poli(3HPV) es sintetitza quan s'exhaureix l'àcid nonanoic. Kelley *et al.*, (1999) també descriuen la formació d'aquest tipus grànuls en *R. eutropha* quan es controla el règim d'alimentació (excés de fructosa i concentració limitant d'àcid valèric). En aquest cas, mitjançant microscòpia electrònica de transmissió i tinció amb  $\text{RuO}_4$ , s'observa la formació de grànuls on el nucli està format per poli(3HB-co-3HV) i les capes externes per P(3HB). Les capes externes de P(3HB) es sintetitzen un cop l'àcid valèric està exhaurit. Els grànuls en capes representen tan sols un 30-40 % dels grànuls totals. Això es degut al fet que els grànuls tendeixen a la coalescència i que l'inici de la formació dels grànuls no té lloc al mateix temps (Kelley and Srienc, 1999).

Així doncs l'ús d'agents de tinció com el  $\text{RuO}_4$ , el  $\text{OsO}_4$  i l'acetat d'uranil permet diferenciar les diferents fases d'un copolímer. Aquests reactius, tenyeixen preferentment la part amorfa dels polímers ja que tenen una major difusió i un major temps de residència.



**Figura 1.5.** Grànuls en capes: Formació d'un grànul de PHA amb diferents capes com a conseqüència de l'alimentació seqüencial amb dues fonts de carboni, que presenten diferent afinitat als agents de tinció emprats a Microscòpia electrònica de transmissió. Model segons Kelley *et al.* 1999 (Kelley and Srienc, 1999).

### 1.2.6 Síntesi de PHAs de disseny

Fins al moment s'han descrit PHAs de cadenes lineals (Brandl *et al.*, 1988), (Lageveen *et al.*, 1988), (Gross *et al.*, 1989), ramificats (Fritzsche *et al.*, 1990), (Lenz *et al.*, 1992), saturats, insaturats i fins i tot monòmers amb grups aromàtics (Fritzsche *et al.*, 1990). Ara bé existeix un interès especial en la introducció de grups funcionals a les cadenes laterals tals com dobles enllaços (Lageveen *et al.*, 1988), triples enllaços (Kim *et al.*, 1998), grups halògens (Kim *et al.*, 1992), (Doi and Abe, 1990) i grups acetoxi i cetona.

Tal i com s'ha comentat en l'apartat 1.2.2, la composició monomèrica del polímer depèn del substrat escollit, entre d'altres factors. Així doncs, quan es treballa amb una font de carboni que conté grups funcionals, la tendència del microorganisme és incorporar aquests grups a les cadenes laterals durant la biosíntesi del PHA. Així doncs, s'han descrit un gran nombre de mcl-PHA que contenen grups olefínics, tant en el mig de la cadena com en posició terminal (Huijberts *et al.*, 1992), (Eggink *et al.*, 1992), (Lageveen *et al.*, 1988), (De Waard *et al.*, 1993), (Bassas *et al.*, 2006), grups carboxils esterificats, grups hidroxil i epoxi (Hori *et al.*, 1994). D'altres grups han estat introduïts només en posició terminal com per exemple: bromur (Kim *et al.*, 1992), clorur (Doi and Abe, 1990), fluorur (Hori *et al.*, 1994), el grup fenil (Fritzsche *et al.*, 1990), ciclohexil (Lenz *et al.*, 1992), (Kim *et al.*, 2001), ciano (Lenz *et al.*, 1992), fenoxi (Kim *et al.*, 1995), p-ciano i p-nitrofenoxi (Kim *et al.*, 1995) o el tiofenoxi (Takagi *et al.*, 1999).

A més a més de la gran versatilitat, en termes de composició, que presenten els mcl-PHAs funcionalitzats s'ha de considerar la possibilitat de realitzar modificacions químiques a posteriori per canviar o millorar les propietats del polímer original.

Les modificacions químiques són una eina que permet “modular” les propietats bàsiques del polímer o fins i tot introduir grups funcionals que no poden ser introduïts per biosíntesi. Aquestes modificacions postbiosintètiques permeten augmentar la reactivitat química del polímer, fer-los reaccionar amb substàncies bioactives o fins i tot regular el balanç hidrofòbic/hidrofílic del material.

Es pot distingir entre dos tipus de modificacions químiques:

- i. Les modificacions que actuen a nivell de la cadena central o esquelet del polímer com per exemple l'hidròlisi completa del polímer per a l'obtenció dels monòmers hidroxialcanoats quirals (Hirt *et al.*, 1996b),(Hirt *et al.*, 1996a).

Una altra possibilitat és la degradació del polímers i la generació d'oligòmers. Aquests oligòmers poden ser emprats per a la síntesi de copolímers de bloc (Saad *et al.*, 1999), (Andrade *et al.*, 2002).

- ii. El segon tipus de modificacions té lloc a les cadenes laterals del polímer. En general són reaccions anàlogues a les que es poden realitzar en els plàstics convencionals. En el cas del mcl-PHA amb insaturacions a les cadenes laterals (polihidroxiàlquenoats) s'han realitzat reaccions d'entrecruament (Dufresne *et al.*, 2001), (Hazer *et al.*, 2001), reaccions d'epoxidació (Bear, 1997) i la conversió de dobles enllaços a grups diol (Lee *et al.*, 2000) o a àcids carboxílics (Kurth, 2002).

Malgrat que la modificació (química) és una eina molt útil i potent a l'hora de "dissenyar" polímers amb propietats predeterminades, fins al moment ha estat molt poc emprada. Lee *et al.*, (2000), mitjançant reacció química de les cadenes insaturades del PHA amb permanganat potàssic (KMnO<sub>4</sub>) han descrit la reacció de dihidroxilació i de carboxilació (Lee *et al.*, 2000). Ara bé, com a conseqüència de l'impediment estèric de les cadenes laterals, la conversió no és completa. De totes maneres, la conversió parcial dels grups funcionals és suficient per a canviar la solubilitat dels polímers modificats. Així doncs, el PHA abans de ser modificat era soluble en cloroform i completament insoluble en dissolvents polars, en canvi els polímers modificats, amb grups diol o grup carboxil, són solubles en acetona/aigua i aigua/bicarbonat, respectivament. La solubilitat d'un polímer té un paper important en les propietats dels materials (p.e: hidrogels). Considerant totes les possibles rutes de biosíntesi dels mclPHAs, la incorporació d'un grup diol o d'un grup carboxil per síntesi microbiològica és molt difícil. Per tant, en aquest cas la síntesi orgànica (derivatització química) és un bon complement de la bioquímica.

Un altre exemple és la conversió dels grups insaturats de les cadenes de PHA a grup epoxi per reacció amb àcid m-clorperbenzoic (MCPBA). En aquest cas, amb la conversió a grups epoxi s'aconsegueix un polímer amb una major reactivitat química i per tant molt útil per a posteriors reaccions químiques.

Una altra modificació important emprada per als mcl-PHA insaturats és la reacció d'entrecruament del material. Aquesta reacció es pot realitzar emprant reactius químics (p.e: sulfurs o peròxids) o bé amb radiació (UV, gamma, feix electrons) (Ashby *et al.*,

1998), (Ashby *et al.*, 1998). En qualsevol dels casos, la reacció d'entrecruament d'aquests materials origina un canvi molt brusc en les propietats del polímer, ja que el converteix en un material més elàstic i menys viscos. La gran avantatge dels PHAs reticulat *versus* les gomes tradicionals és la seva biodegradabilitat.

La demanda de plàstics a nivell mundial creix dia a dia i malgrat que la recerca en el camp dels biopolímers ha estat important en els darrers anys, a Europa, Japó i en menys grau en els EEUU, és el sector privat el que suporta econòmicament el desenvolupament d'aquests nous materials alternatius als plàstics tradicionals. El mercat global dels polímers biodegradables excedeix els 168 milions d'euros anuals i s'espera un increment del 12.6% per any fins arribar a 304 milions d'euros l'any 2010 (Philip *et al.*, 2007). Tot i que els PHAs han estat comercialitzats des de fa 20 anys, aquest nínxol de mercat està molt afectat per certs factors com són el seu elevat cost de producció, la manca d'infraestructura industrial i les fortes restriccions legislatives per a treballar amb alguns d'aquests materials. La idea d'obtenir nous biopolímers amb propietats fisicoquímiques específiques i sintetitzats només controlant la composició de la font de carboni va generar de seguida un fort interès industrial. No obstant, l'elevat cost de producció ha perjudicat el progrés de la comercialització dels PHAs. Tot i que alguns d'aquests biopolímers han demostrat tenir millors característiques que alguns dels plàstics convencionals, encara queda molt camí per a recórrer per tal de fer viables econòmicament aquests polímers biològics. Només en alguns camps de recerca molt específics, com el camp de la biomedicina, on l'elevat cost de producció queda justificat per l'obtenció de productes d'alt valor afegit.

Malgrat que inicialment els PHAs foren considerats com una alternativa als plàstics convencionals, actualment els PHAs comencen a ser considerats com a una nova generació de biomaterials amb múltiples aplicacions.